

別添 1

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした  
新規急性経口投与毒性試験方法の開発  
-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-  
(19KD1002)

平成 31 年/令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋祐次

令和 2(2020)年 3 月

## 研究報告書目次

### I. 総括報告書

バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発  
-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-

高橋 祐次 ..... 1

### II. 分担研究報告書

1. バイタルサインセンサーの開発及び研究統括

高橋 祐次 ..... 11

2. 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

北嶋 聡 ..... 18

3. 急性経口投与毒性による行動様式影響における非侵襲的な新規バイタルサインの探索

種村 健太郎 ..... 27

4. バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

相崎 健一 ..... 31

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 倫理審査等報告書の写し

# I. 総括報告書

**バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発  
-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-(19KD1002)  
総括報告書**

研究代表者 高橋祐次 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター  
毒性部 第三室 室長

## 研究要旨

本研究の目的は、Reduction と Refinement によりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン(VS)」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD<sub>50</sub>)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。

急性毒性試験は時代と共に簡便化され、使用する動物数が削減された。しかし、試験のエンドポイントは動物の「死亡」のままであり、死因、標的臓器等その内容は一切考慮されていない。そのため、ヒトの中毒治療に有用ではないとの批判がある。一方、動物福祉の観点から「死亡」をエンドポイントとすることに強い批判がある。そのため、代替法(Replacement)として、細胞毒性の IC<sub>50</sub> を指標として急性毒性を評価する方法が ICCVAM と ECVAM から提案されているが、難溶性物質、代謝活性化による毒性発現物質、心臓や神経系など臓器特異的な毒性評価を代替するに至っていない。しかし、一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などの VS を指標とした更なる動物数の削減とヒトの安全性確保の向上を可能とする「新規急性経口投与毒性試験方法」が、近年の IT デバイスの小型化と新素材センサーの出現により開発可能となった。具体的には1匹の実験動物から多項目に亘る VS を取得することにより毒性徴候を精緻に解析・定量化し、計算科学によって化学物質の急性毒性の強度と毒性標的の合理的判定基準を作成し、ヒトが急性曝露された際の危険度をより正確に予測する事を可能とする。これにより、毒劇法の指定に関して、中毒事象を含むより現実に想定される事故等に即した規制が可能となる。言い換えると、ヒトの急性中毒患者が救急外来で受ける諸検査に該当する所見を 1 匹の実験動物から取得する試験法の開発である。

本研究は 4 つの分担研究課題を設定している。初年度となる H31/R1 年度は、①神経毒性物質である TTX のマウス海馬における遺伝子発現変動解析を行い、ストレス関連遺伝子の発現が高い一方で、Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められないことを明らかとした。②マウス及びラットを用いて本研究の基盤となる行動、体温、心拍、血圧等の VS 測定装置のセットアップを行い、先行研究においてデータが豊富であるモデル化学物質を使用して基礎データの取得に成功した。③新規素材であるカーボンナノチューブ(CNT)センサーの実装に向けたセンサーの加工及び装着方法を

検討し心電波形の取得に成功した。④従来の目視観察による記述式の一般状態観察による毒性発現をバイタルサイン計測データ取得によりスコア化することによって標準化に資する基礎データを取得した。

TTXのように作用部位が極めて限定的な物質であっても、その生体影響はTTXが直接関与するシグナルネットワークとは異なる事が示唆されたことから、急性毒性指標としての妥当性の確認に遺伝子発現変動解析は極めて有効であることが示された。現在は商業的に入手可能なVS測定装置と新規開発のCNTセンサーを並行して使用し実験を実施しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

## 研究分担者

北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長
相崎健一	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第一室 室長
種村健太郎	東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野 教授

## A. 研究目的

本研究の目的は、ReductionとRefinementによりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD<sub>50</sub>)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。

急性毒性試験は時代と共に簡便化され、使用する動物数が削減された。しかし、試験のエンドポイントは動物の「死亡」のみであり、死因、標的臓器等その内容は一切考慮されていない。そのため、ヒトの中毒治療に有用ではないとの批判がある。一方、動物福祉の観点から「死亡」をエンドポイントとすることに強い批判がある。そのため、代替法(Replacement)として、細胞毒性のIC<sub>50</sub>を指標として急性毒性を評価する方法がICCVAMとECVAMから提案されているが、難溶性物質、代謝活性化による毒性発現物質、心臓や神経系など臓器特異的な毒性評価を代替するに至っていない。

しかし、一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、

脳波などの「バイタルサイン」を指標とした更なる動物数の削減とヒトの安全性確保の向上を可能とする「新規急性経口投与毒性試験方法」が、近年のITデバイスの小型化と新素材センサーの出現により開発可能となった。具体的には1匹の実験動物から多項目に亘るバイタルサインを取得することにより毒性徴候を精緻に解析・定量化し、計算科学によって化学物質の急性毒性の強度と毒性標的の合理的判定基準を作成し、ヒトが急性曝露された際の危険度をより正確に予測する事を可能とする。これにより、毒物及び劇物取締法の指定に関して、中毒事象を含むより現実に想定される事故等に即した規制が可能となる。言い換えると、ヒトの急性中毒患者が救急外来で受ける諸検査に該当する所見を1匹の実験動物から取得する試験法の開発である。

本研究は二つの大きな柱からなる。第一の柱は、今までの情報や経験から選択したVSの諸項目の、急性毒性指標としての妥当性、再現性、信頼性、を確認する研究である。これには、①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析、②急性毒性試験における行動解析の二つを分担研究課題として設定した。第二の柱は、選択したVSの諸項目を正確に、実験動物から測定するためのデバイスの改良である。これには、③新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発、④バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発を分担研究課題として設定した。

## B. 研究方法

### B-1 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

急性毒性発現時の海馬、肺、肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析を実施した。具体

的には、被験物質を単回経口投与後、得られたマウスの海馬を含む脳4部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。4用量、4時点の遺伝子発現情報を既に開発済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器連関及びインフォマティクス解析の開発を進める計画である。

H31/R 元年度は、被験物質としてテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX、純度 95.7%、富士フィルム和光純薬(株))を選択した。金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)を用いて強制経口投与し、投与後の時間4点(投与2, 4, 8及び24時間後)、投与用量各 300, 100, 30, 0 µg/kg(溶媒:0.1%酢酸を含む0.5%MC, pH3.5)の4点からなる計16群、各群3匹、合計48匹のマウスについて解析を行った。

用量設定のため、TTX のマウス経口 LD50 値が 334 µg/kg (RTECS 情報)であったことから、最高用量を 700 µg/kg とし3段階の用量(700, 500, 300 µg/kg、及び溶媒対照)を設定し、予備試験を実施した。12週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、各群3匹に単回経口投与した。その結果、700 µg/kg 群では全例、500 µg/kg 群では2例に死亡が認められたが、300 µg/kg 投与群では死亡例はみられなかった。この結果から、24時間無作用量であった 300µg/kg を最高用量をとし、公比 $\sqrt{10}$  で除して 300, 100, 30µg/kg の投与用量を設定した。

## B-2 急性毒性試験における行動解析

### 1. マウス:

C57BL/6NCrSlc 成熟雄マウスを使用して、既存の行動解析装置により急性経口毒性発現時の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響を調べた。この測定に並行して、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化を測定した。また、げっ歯類においては超音波発声がコミュニケーションに用いられていることが知られていることから 3-4 匹を

1 群として超音波測定装置(特注品、加藤建築環境研究所)による聴音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)を計測し、非侵襲的に取得可能なバイタルサインとしての利用について検討した。

被験物質として、TTX (300 µg/kg)、Acephate (50,300 mg/kg)、Trichlorfon (50 mg/kg)、Amitriptyline hydrochloride (50 mg/kg)を用いた。

### 2. ラット:

CrI:CD(SD)雌性ラット8~12週齢を用いて、既存の血圧測定装置を用いた被験物質投与による血圧への影響を調べた。並行して赤外線サーモグラフィによる体表面温度測定を実施した。

ラットの飼育ケージは、ポリカーボネイト製のケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1ケージ当り1~2匹のラットを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置(RAIR HD SUPER MOUSE 750TM 個別換気式飼育装置特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1℃、湿度;55±5%、換気回数;約20回/h、照明時間;8時~20時点灯(照明明暗サイクル12時間)とし、固型飼料 CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し給水瓶により自由摂取させた。

血圧計は無加温型非観血式血圧計(MK-2000ST、室町機械株式会社)を用い、ラット尾動脈にて心拍数、最高血圧、最低血圧及び平均血圧を測定した。並行して赤外線サーモグラフィ(サーモフレックス F50B-STD、協和テクノロジーズ)による体表温度の変化を調べた。

被験物質として Acephate (5, 50, 300 mg/kg)、Amitriptyline hydrochloride (5,50 mg/kg)を用いた。

### 3. 用量設定:

マウス及びラットの実験で用いた用量段階は、TTX を除き、OECD 化学物質試験に関するガイドライン TG423(毒性等級法)にて設定されている 5 mg/kg、50 mg/kg、300 mg/kg 及び 2,000 mg/kg の4段階から選択した。

### B-3 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発

#### 1. 心電用センサーの開発:

二層カーボンナノチューブ (Double-Walled Carbon Nanotube:DWCNT)を基にしたCNTヤーン(Sugikuro@yarn, sugi nano carbon technology 合同会社)を用い、バイタルサイン測定のための電極(以下、CNT センサー)として利用について検討した。H31/R1年度は、生体電位の中で比較的データの取得が容易である心電を対象に開発を行った。CNTヤーンは、①井上リボン工業株式会社(越前市)にて織物技術による加工を行った皮膚に接触させる表面電極としての使用、または②CNT ヤーンのまま動物の皮膚に縫合針(外科強角針 No.0 バネ穴、夏目製作所)を用いて単結紮した状態で使用した。

並行して、表面電極を装着するためのラット用ジャケットの開発に取り組んだ。具体的には、8及び12週齢のSDラット(雌)から3Dスキャナーにより三次元データを取得し、3Dプリンターにて硬質樹脂製のラット模型を作製した。この模型を基にシリコン樹脂製のラット模型を作製し、ジャケットを作製するひな形とした。ジャケットの加工は井上リボン工業にて行った。

#### 2. 動物を用いたCNTセンサーの性能評価:

CNTセンサーの装着前にラットの背部を動物用バリカンで刈り皮膚を露出させた。表面電極はラットが覚醒した状態で装着した。CNTヤーンを皮膚に単結紮して使用する際は、イソフルラン(ファイザー)麻酔下で、耳介、頸部、背部及び腰部の3か所に一針単結紮を行い、プレアンプと接続した。

CNTセンサーからのデータは①プレアンプ(特注品、バイオテックス)を介してA/Dコンバータ(MP160、バイオパック)と有線接続、または、②A/D変換・トランスミッター(BITalino (r)evolution)を用いて無線接続によりPCにてデータを取得した。

### B-4 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

#### 1. 既存情報の調査:

「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の定義に組み込

むのに適したバイタルサイン項目の抽出とそれらの重み付けの参考になる情報として、既存の情報を調査した。臨床医学、特に中毒学の情報源としては、日本中毒学会が編纂した成書を中心に参照した。化学物質の毒性・安全性の評価書としては、国立医薬品食品衛生研究所の既存化学物質毒性データベース([https://dra4.nihs.go.jp/mhlw\\_data/jsp/SearchPage.jsp](https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp))より入手したものを参照した。

#### 2. ソフトウェア生成:

Windows環境でのスタンドアロンソフトウェア作成においては、開発効率と生成する実行バイナリの実行速度を重視して、RAD(Rapid Application Development)対応のDelphi(Object Pascal言語の一派生、USA, Embarcadero Technologies, Inc.)を用いた。データベースエンジンには組込型のDBISAM(USA, Elevate Software, Inc.)を、一般的なグラフ描画にはTeeChart(Spain, Steema Software SL)を利用した。

人工知能利用の試行については、関連ライブラリが充実しているPython言語を使用した(特にデータサイエンス指向のAnacondaディストリビューションを使用)。主なライブラリとしてはNumpy(数値処理)やTensorFlow(機械学習)、scikit-learn(機械学習)、OpenCV(画像処理)を使用した。

#### 3. 計算精度検証:

精度検証は必要に応じてExcel(USA Microsoft Corporation)やR言語(オープンソース R Development Core Team)で実施し、浮動小数点誤差以上の乖離がないことを確認した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し、国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程(平成27年4月版)」、東北大学大学院農学研究科では、「国立大学法人 東北大学環境・安全委員会 動物実験専門委員会内規」に則って実施した。

## C. 研究結果

### C-1 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

H31/R1 年度は、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(TTX)を、12 週齢の雄性マウスに単回経口投与した際の(4 用量、4 時点、各群 3 匹、計 48 匹)、脳の内、背景データが多く揃っている海馬における網羅的遺伝子発現変動解析をおこなった結果、ストレス関連遺伝子(Sgk1 遺伝子など)の発現増加が目立ち、他方、Na+チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。肝における解析を今後検討予定であり、多臓器連関を解析する計画である。

具体的には、解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意(t 検定での各時点毎に溶媒対照との間で P 値<0.05)で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 286 プローブセット(ps) が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 121 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 508 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものは抽出されなかった。

### C-2 急性毒性試験における行動解析

#### 1. マウス:

TTX 投与群に体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が、また Acephate 投与群においても体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が観察され、特に Acephate 300 mg/kg 投与群では、重度の振戦と瞬目不全が観察された。尚、いずれの投与群にも超音波発声の確認には至らなかった。

#### 2. ラット:

Acephate 投与群においては、5 mg/kg において血圧低下、体温上昇がみられ、50 mg/kg では心拍数低下もみられた。300 mg/kg においては顕著な心拍数低下と血圧上昇がみられ伏臥位、呼吸異常がみられた。体表面温度は、僅かな低下がみられたが、

尾部は顕著な温度上昇がみられた。

Amitriptyline Hydrochloride では、5mg/kg 投与により一過性の軽度の心拍数低下し体表面温度は上昇した。50mg/kg 投与では一過性の心拍数増加がみられた。血圧には影響はみられなかった。体表面温度は低下した。

### C-3 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発

無線による方法を用い、CNT センサーを動物の皮膚に単結紮した状態で、心電波形の取得に成功した。一方、表面電極 CNT センサーは体動によるノイズレベルが高く、明確な心電波形を取得することができなかった。

有線による方法では表面電極 CNT センサー、皮膚に単結紮した CNT センサーもノイズレベルが非常に高く、データを取得することが出来なかった。得られたデータの解析により 50Hz 及びその倍数成分が高いレベルで混在していたことから、商用電源からのノイズであることが判明した。

### C-4 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

初年度である H31/R1 年度はバイタルサイン取得デバイスの開発中であり、評価対象とすべき実データを得られない。このため既存の情報から、パラメータに適したバイタルサイン項目の抽出や、「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の定義においてバイタルサイン項目毎の重み付け設定の参考になり得る情報の収集を実施した。

具体的には、臨床医学、特に内科診断学や中毒学の成書より、ヒトの治療において臨床医が重要視するバイタルサイン項目を抽出し、症状や曝露した化学物質などの状況に応じた重要度を、生物学的な根拠と共に調査した。同様に、化学物質の毒性・安全性に関する評価書からバイタルサイン項目を抽出し、それぞれのバイタルサイン項目の評価判断への寄与から当該項目の重要度を推定した。

臨床医学関連の成書を調査した結果では、一般所見のうち実験動物でも観察可能なバイタルサイン項目としては行動異常(情動認知障害(知覚異常、幻覚、意識障害、傾眠、興奮状態など)、運動機能を含む)や脈(心拍)、呼吸リズム、体温、血圧が重視されていた。また実験動物ではやや観察困難ではあるが、発汗や瞳孔サイズ(縮瞳・散瞳)、痙攣、流涎、尿所見、下痢も重要項目であった。一方、実験動物では観察が難しいバイタルサイン項目としては悪心や頭痛・腹痛等の各種疼痛、呼吸音(聴診)、口渴、排尿困難、皮膚所見(紅潮、皮疹、搔痒)、視覚異常(霧視など)があった。

同様に、化学物質の毒性・安全性に関する評価書を調査した結果では、実験動物の一般所見として頻出していたのは、体重変化、摂餌量・飲水量の変化、であり、特記事項としては、体温変化(低体温)、運動変化(自発運動の低下、運動失調、麻痺、硬直、振戦、痙攣など)、意識状態(傾眠、昏睡、意識消失)、呼吸状態(呼吸促迫、呼吸困難)、皮膚刺激、脱毛、体位(腹臥、横臥)などの記載が見られた。

#### D. 考察

遺伝子発現変動解析において、TTX のマウス海馬への直接作用は弱く、サイトカイン、糖質コルチコイドを介した影響が示唆された。

体表面温度については、Acephate 投与によりマウスでは低下、ラットでは上昇しており、種差がみられた。赤外線サーモグラフィによる体表温度測定はマウス、ラットともに非常に有効なバイタルサインと考えられるが、バイタルサインとしての統合評価に使用するためには、今後、このメカニズムについてらかにする必要があり。

超音波測定装置による聴音波発声については、測定条件を再検討すると共に、可聴域をも含めた解析が必要と考えられた。また、投与後の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目等)影響は、上記の体表温度影響と高い相関があると考えられた為、動画データ取得による解析によって急性毒性指標の設定に向けた高度化が必要である。

血圧測定は有効なバイタルサインである。一般状態観察において活動性が低下した状態と関連していた。本研究で使用している血圧測定装置はげっ歯類専用開発されたものであり、動物の加温が不要である最新の技術が組み込まれている。しかしながら、動物を一時的に拘束する必要があり、データを連続的に測定するには課題がある。

CNT センサーの開発では、皮膚結紮と無線 A/D コンバータの組み合わせで心電波形の取得が可能であった。表面電極でのノイズは、体動によりセンサーの接触性が低下することが原因であり、表面電極と皮膚との接触性を高める形状の検討、並びにジャケットの改良が必要となる。実際にヒトにおいて、体動が生じないようにすることで心電波形の取得が可能となっている。特筆すべきは、CNT センサーは導電性ペーストが不要であることである。これは、動物実験に使用するセンサーとして非常に優れた特性である。

皮膚結紮による方法は、表面電極に比較して作業が多くなるが、ラットの個体識別に使用される耳パンチと同程度の作業量であるため、動物実験へ組み込むことへの難易度は低いと考えられる。次年度はこの手法による脳波測定に取り組む計画である。この手法により脳波が取得できれば、現在、一般的に使用されている方法である動物の頭蓋骨を穿孔して金属電極を埋め込む手法よりも簡便で侵襲性が極めて低い。

統合的解析方法(ソフトウェア)の開発においては、従来の目視観察による記述式の一般状態観察による毒性発現をバイタルサイン計測データ取得によりスコア化することによって標準化する為の基礎データを取得した。

化学物質の毒性・安全性に関する評価書では、一般所見に類すバイタルサイン項目の記載は体重変化と摂餌量・飲水量の変化がほとんどであり、これら以外のバイタルサイン項目は異常があった場合に必要に応じて言及される程度であり、副次的な扱いであった。ほとんど全ての評価書においては病理検査(データがある場合は血液学検査、血液生化学検査)の結果を毒性・安全性の評価の主たる根拠に採用していた。臨床医療においても画像診断や血液及び尿検査の結果を重視する同様の傾向があるが、一般

的な診察においてバイタルサインによる健康状態の推察は基本技術であり、実験動物を用いた毒性試験ほどにバイタルサインが軽視されることは少ない。適切なバイタルサイン項目を選択し、正確且つ高感度に実験動物の状態変化を観察・測定することができれば、検体である化学物質の毒性分子機序の推定に至ることは稀であっても、「概略の致死量」の推定に有効活用できる可能性は高いと考えられる。

実データが得られていない現時点で考察するのは尚早であるが、①少なくとも *Acute Toxicity Vital Signs Score*(仮称)の定義内容を検討する初期段階では、異常状態のデータ数が正常(無処置)状態のデータ数より大幅に少ないと予想されること、及び②研究初期から毒性分子機序に基づく *Acute Toxicity Vital Signs Score*(仮称)の定義は困難と考えられること、から、複数のバイタルサイン項目からの「概略の致死量」の推定を実現するためには、従来からの統計を含む数理的手法だけでなく、近年急速に発展した人工知能、特に深層学習を利用した手法の有用性が期待された。例えば、3層程度のニューラルネットワークにおいて、入力層と出力層に同じデータを用いて入力＝出力となるように教師あり学習をさせる *autoencoder* というアルゴリズムは、バイタルサインデータの異常検出に利用可能と考えられる。

## E. 結論

初年度となる H31/R1 年度は、①神経毒性物質である TTX のマウス海馬における遺伝子発現変動解析を行い、ストレス関連遺伝子の発現が高い一方で、Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められないことを明らかとした。②マウス及びラットを用いて本研究の基盤となる行動、体温、心拍、血圧等の VS 測定装置のセットアップを行い、先行研究においてデータが豊富であるモデル化学物質を使用して基礎データの取得に成功した。③新規素材であるカーボンナノチューブ(CNT)センサーの実装に向けたセンサーの加工及び装着方法を検討し心電波形の取得に成功した。④従来の目視観察による記述式の一般状態観察による毒性発現をバイタルサイ

ン計測データ取得によりスコア化することによって標準化に資する基礎データを取得した。現在は商業的に入手可能なバイタルサイン測定装置と新規開発の CNT センサーを並行して使用し実験を実施しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H.: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600-608, 2019

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. *Arch Toxicol*. 2019 Feb 13.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Abdou KA, Takahashi S, Alexander DB, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in

the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration. Part Fibre Toxicol. 2019 Sep 2;16(1):34.

Yamashita S, Kogasaka Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sendai Y. Suppression of mosaic mutation by co-delivery of CRISPR associated protein 9 and three-primer repair exonuclease 2 into porcine zygotes via electroporation. J Reprod Dev. 2019 Nov 24.

Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K. Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and glial population in adult male mice. J Appl Toxicol. 2019 Dec;39(12):1651-1662.

Goto M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Differences in resistance against osmotic challenge among C57BL/6, DBA/2 and their hybrid mice metaphase II (MII) stage oocytes. Zygote. 2019 Aug;27(4):250-254.

Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. Reprod Med Biol. 2019 Jun 9;18(3):247-255.

Kurata S, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. J Reprod Dev. 2019 Aug 9;65(4):327-334.

Umezu K, Yajima R, Hiradate Y, Yanai R, Numabe T, Hara K, Oikawa T, Tanemura K. Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. J Reprod Dev. 2019 Apr 12;65(2):147-153.

## 2. 学会発表

北嶋 聡、シックハウス(室内空気汚染)対策に関する

研究-シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測-、環境科学会 2019 年会(2019.9.13.)

北嶋 聡、近藤一成、ゲノム編集技術応用食品の現状と課題、日本食品化学学会 第 35 回食品化学シンポジウム (2019.11.8.)

登田 美桜、北嶋聡、フグ毒として知られるテトロドトキシンのリスク評価に関する国際的動向-マウスユニットと急性参照用量-、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.26.)

種村 健太郎、北嶋聡、菅野 純、発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現~海産毒による異常誘発モデルとしての検討~、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.26.)

小野 竜一、相崎 健一、北嶋聡、菅野 純、Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.26.)

菅野 純、北嶋聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 -「新型」反復曝露試験の解析-、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.28.)

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋聡、Samik GOSH、北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.28.)

種村 健太郎、北嶋聡、菅野 純、低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性~子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在~、第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.28.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.)

- Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi, Evaluation of Exosomes as Toxic Biomarkers, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)
- Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore
- Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019, Poster
- 高橋祐次、新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアルの高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発-、JST-CRDS 2019年度 科学技術未来戦略WS、2019.12.3(東京)
- 倉田笙平、小塩健介、高森広典、梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ブタ精子機能に対する GABA 影響解析」日本畜産学会第 127 回大会 (2020.3.25-28)、京都府
- 酒井和哉、原健士朗、種村健太郎「精巢毒性モデルマウスにおける精子エピゲノム影響評価」第 42 回日本分子生物学会年会 (2019.12.3-6)、博多市
- 影山恵理、沼邊孝、種村健太郎、原健士朗「ウシ精巢の対外培養における PDMS 製カバーの有用性」第 126 回日本畜産学会大会 (2019.9.17-20)、盛岡市
- 牧野優誠、平館裕希、矢内凜、齊藤洋克、原健士朗、種村健太郎「ニコチン型アセチルコリン受容体シグナルを利用したマウス精子機能の調節」第 112 回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市
- 倉田笙平、平館裕希、梅津康平、原健士朗、種村健太郎「 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を利用した精子機能制御法の開発に資する研究」第 112 回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市
- 矢内凜、平館裕希、原健士朗、藤井渉、佐原成彦、種村健太郎「タウ欠損マウスを用いた精子におけるタウ類似タンパクの発現様式」第 112 回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市
- 梅津康平、平館裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシ精子を卵母細胞に導く走化性因子の特定」第 112 回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市
- Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura 「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in adult male mice」the 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV) (2019.7.15-18) ホノルル
- 種村健太郎「非侵襲的な早期精巢毒性バイオマーカーとしての精子エピゲノム影響評価」第 38 回日本アンドロロジー学会学術大会 (2019.6.21-22) 大阪府

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「低用量科学物質の周産期ばく露による情動認知行動動毒性～子どもの毒性額にむけた評価系開発の現在～」第46回日本毒性学会学術年会（2019.6.26-28）徳島市

種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～」第46回日本毒性学会学術年会（2019.6.26-28）徳島市

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告書

**バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-(19KD1002)**

**分担研究報告書**

**分担研究課題 バイタルサインセンサーの開発及び研究統括**

研究分担者:	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者:	栗形麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者:	大久保佑亮	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 主任研究官
研究協力者:	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	辻昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	相田麻子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

**研究要旨**

本研究の目的は、Reduction と Refinement によりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD<sub>50</sub>)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。

本分担研究では、一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などのバイタルサイン(VS)測定と、VS 測定のためのセンサーの開発を行った。初年度となる H31/R1 年度は、現在、市販品として入手可能な測定器のセットアップを行い体温、血圧を測定した。急性毒性を誘発するモデル化合物として、先行研究においてデータが豊富である有機リン系農薬 Acephate (50, 300 mg/kg)と、中枢神経と心臓への作用が知られている Amitriptyline hydrochloride (5, 50 mg/kg)を用いた。並行して、新規素材であるカーボンナノチューブ(CNT)のヤーンを用い、心電測定に取り組んだ。センサーの実装に向けたセンサーの加工及び装着方法を検討し心電波形の取得に成功した。現在は商業的に入手可能な VS 測定装置と新規開発の CNT センサーを並行して使用し実験を実施しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

## A. 研究目的

本研究の目的は、ReductionとRefinementによりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD50)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。

急性毒性試験は時代と共に簡便化され、使用する動物数が削減された。しかし、試験のエンドポイントは動物の「死亡」のままであり、死因、標的臓器等その内容は一切考慮されていない。そのため、ヒトの中毒治療に有用ではないとの批判がある。一方、動物福祉の観点から「死亡」をエンドポイントとすることに強い批判がある。そのため、代替法(Replacement)として、細胞毒性のIC50を指標として急性毒性を評価する方法がICCVAMとECVAMから提案されているが、難溶性物質、代謝活性化による毒性発現物質、心臓や神経系など臓器特異的な毒性評価を代替するに至っていない。

しかし、一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などの「バイタルサイン」を指標とした更なる動物数の削減とヒトの安全性確保の向上を可能とする「新規急性経口投与毒性試験方法」が、近年のITデバイスの小型化と新素材センサーの出現により開発可能となった。具体的には1匹の実験動物から多項目に亘るバイタルサインを取得することにより毒性徴候を精緻に解析・定量化し、計算科学によって化学物質の急性毒性の強度と毒性標的の合理的判定基準を作成し、ヒトが急性曝露された際の危険度をより正確に予測する事を可能とする。これにより、毒物及び劇物取締法の指定に関して、中毒事象を含むより現実に想定される事故等に即した規制が可能となる。言い換えると、ヒトの急性中毒患者が救急外来で受ける諸検査に該当する所見を1匹の実験動物から取得する試験法の開発である。これを実現するため、先行研究においてデータが豊富なモデル化合物を用いてラットにおける急性影響を調べた。並行して、新規素材であるカーボンナノチューブ(CNT)のヤー

ンを用い、心電測定に取り組んだ。

## B. 研究方法

### B-1 ラットを用いた化学物質の急性影響評価

#### 1. 使用動物:

CrI:CD(SD)雌性ラット 8~12 週齢を用いて、既存の血圧測定装置を用いた被験物質投与による血圧への影響を調べた。並行して赤外線サーモグラフィによる体表面温度測定を実施した。

ラットの飼育ケージは、ポリカーボネイト製のケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1ケージ当り1~2匹のラットを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置(RAIR HD SUPER MOUSE 750TM 個別換気式飼育装置特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1℃、湿度;55±5%、換気回数;約 20 回/h、照明時間;8 時~20 時点灯(照明明暗サイクル 12 時間)とし、固型飼料 CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し給水瓶により自由摂取させた。

#### 2. 被験物質:

被験物質として、Acephate(富士フィルム和光純薬(株))、Amitriptyline hydrochloride(富士フィルム和光純薬(株))を用いた。用量段階は、TTXを除き、OECD 化学物質試験に関するガイドライン TG423(毒性等級法)にて設定されている 5 mg/kg、50 mg/kg、300 mg/kg 及び 2,000 mg/kg の4段階から選択し、RTECS の情報を基に LD50 以下の用量を投与した。

#### 3. バイタルサイン測定:

バイタルサインは実験動物用として入手可能な装置を用いて測定した。血圧計は無加温型非観血式血圧計(MK-2000ST、室町機械株式会社)を用い、ラット尾動脈にて心拍数、最高血圧、最低血圧及び平均血圧を測定した。並行して赤外線サーモグラフィ(サーモフレックス F50B-STD、協和テクノロジーズ)による体表温度の変化を調べた。

## B-2 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発

### 1. 心電用センサーの開発:

二層カーボンナノチューブ (Double-Walled Carbon Nanotube: DWCNT) を基にした CNT ヤーン (Sugikuro® yarn, sugi nano carbon technology 合同会社) を用い、バイタルサイン測定のための電極 (以下、CNT センサー) として利用について検討した。H31/R1 年度は、生体電位の中で比較的データの取得が容易である心電を対象に開発を行った。CNT ヤーンは、①井上リボン工業株式会社 (越前市) にて織物技術による加工を行った皮膚に接触させる表面電極としての使用 (図 1A)、または②CNT ヤーンのまま動物の皮膚に縫合針 (外科強角針 No.0 バネ穴、夏目製作所) を用いて単結紮した状態で使用した。

並行して、表面電極を装着するためのラット用ジャケットの開発に取り組んだ。具体的には、8 及び 12 週齢の SD ラット (雌) から 3D スキャナーにより三次元データを取得し、3D プリンターにて硬質樹脂製のラット模型を作製した。この模型を基にシリコン樹脂製のラット模型を作製し、ジャケットを作製するひな形とした。ジャケットの加工は井上リボン工業にて行った (図 1)。

### 2. 動物を用いた CNT センサーの性能評価:

CNT センサーの装着前にラットの背部を動物用バリカンで刈り皮膚を露出させた。表面電極はラットが覚醒した状態で装着した。CNT ヤーンを皮膚に単結紮して使用する際は、イソフルラン (ファイザー) 麻酔下で、耳介、頸部、背部及び腰部の 3 か所に一針単結紮を行い、プレアンプと接続した。

CNT センサーからのデータは①プレアンプ (特注品、バイオテックス) を介して A/D コンバータ (MP160、バイオパック) と有線接続、または、②A/D 変換・トランスミッター (BITalino (r)evolution) を用いて無線接続により PC にてデータを取得した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵

守し、国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」に則って実施した。

## C. 研究結果

### C-1 ラットを用いた化学物質の急性影響評価

Acephate 投与群においては、5 mg/kg において血圧低下、体温上昇がみられ、50 mg/kg では心拍数低下もみられた。300 mg/kg においては顕著な心拍数低下と血圧上昇がみられ伏臥位、呼吸異常がみられた。体表面温度は、僅かな低下がみられたが、尾部は顕著な温度上昇がみられた (図 2)。

Amitriptyline Hydrochloride では、5mg/kg 投与により一過性の軽度の心拍数低下、体表面温度は上昇した。50mg/kg 投与では一過性の心拍数増加がみられたが、血圧には影響はみられなかった。体表面温度は心拍の上昇にともなって一過性に上昇したが、投与後 1 時間では投与前に比較して低下した (図 3)。

### C-2 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発

無線によるデータ転送方法を用い、CNT センサーを動物の皮膚に単結紮した状態で、心電波形の取得に成功した (図 4)。一方、表面電極 CNT センサーは体動によるノイズレベルが高く、明確な心電波形を取得することができなかった。

有線による方法では表面電極 CNT センサー、皮膚に単結紮した CNT センサーもノイズレベルが非常に高く、データを取得することが出来なかった。得られたデータの解析により 50Hz 及びその倍数成分が高いレベルで混在していたことから、商用電源からのノイズであることが判明した。

## D. 考察

現在入手可能なバイタルサイン測定装置を用いて、心拍・血圧・体温測定を行った。心拍・血圧測定は安定した結果が得られたが、測定に際しては動物を保定してセンサーを取り付けることが必要であり、経時

的な測定が困難である。サーモグラフィによる体温測定は非常に簡便かつ鋭敏に変化を捉えることができることから、本研究の目的としては極めて有用であると考えられる。

新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発では、皮膚結紮と無線 A/D コンバータの組み合わせで心電波形の取得が可能であった。表面電極でのノイズは、体動によりセンサーの接触性が低下することが原因であり、表面電極と皮膚との接触性を高める形状の検討、並びにジャケットの改良が必要となる。実際にヒトにおいて、体動が生じないようにすることで心電波形の取得が可能となっている。特筆すべきは、CNT センサーは導電性ペーストが不要であることである。これは、動物実験に使用するセンサーとして非常に優れた特性である。

皮膚結紮による方法は、表面電極に比較して作業が多くなるが、ラットの個体識別に使用される耳パンチと同程度の作業量であるため、動物実験へ組み込むことへの難易度は低いと考えられる。次年度はこの手法による脳波測定に取り組む計画である。この手法により脳波が取得できれば、現在、一般的に使用されている方法である動物の頭蓋骨を穿孔して金属電極を埋め込む手法よりも簡便で侵襲性が極めて低い。

## E. 結論

初年度となる H31/R1 年度は、①ラットを用いて本研究の基盤となる行動、体温、心拍、血圧等の VS 測定装置のセットアップを行い、先行研究においてデータが豊富であるモデル化学物質を使用して基礎データの取得に成功した。②新規素材であるカーボンナノチューブ (CNT) センサーの実装に向けたセンサーの加工及び装着方法を検討し心電波形の取得に成功した。現在は商業的に入手可能なバイタルサイン測定装置と新規開発の CNT センサーを並行して使用し実験を実施しているが、新規経口投与毒性試験の実用化のためには、これらの機器を統合して実験者の利便性を高め、かつ、廉価な装置として開発する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. Arch Toxicol. 2019 Feb 13.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Abdou KA, Takahashi S, Alexander DB, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration. Part Fibre Toxicol. 2019 Sep 2;16(1):34.

### 2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center,

Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019,

Poster

高橋祐次、新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアル  
の高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発、  
JST-CRDS 2019 年度 科学技術未来戦略 WS、  
2019.12.3 (東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

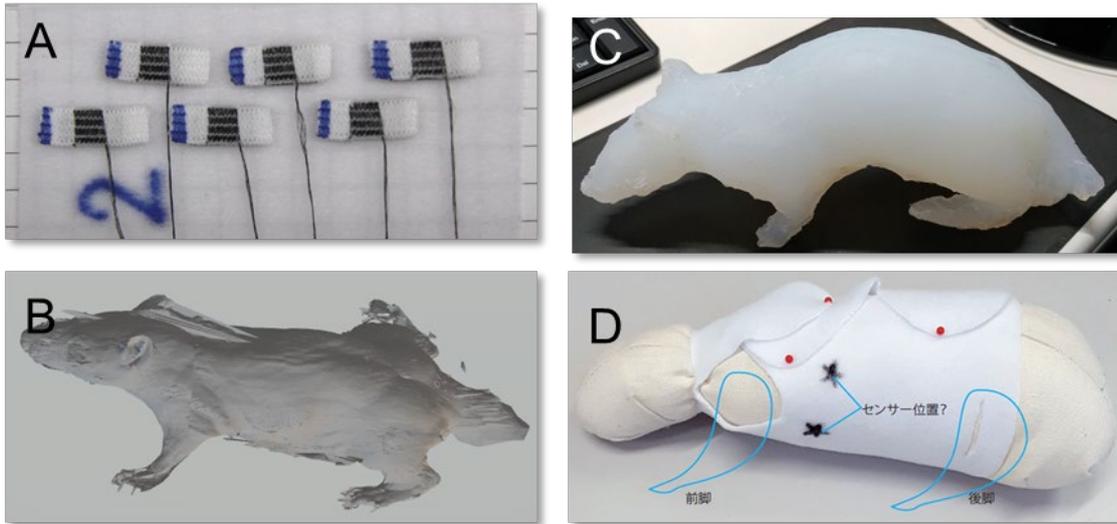


図 1 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発

A: 織物技術による CNT センサーの作製、B: ラット 3D スキャナーデータ、C: 3D プリンターの型を基に作成したシリコン樹脂製のラット模型、D: センサー装着ジャケットの作製

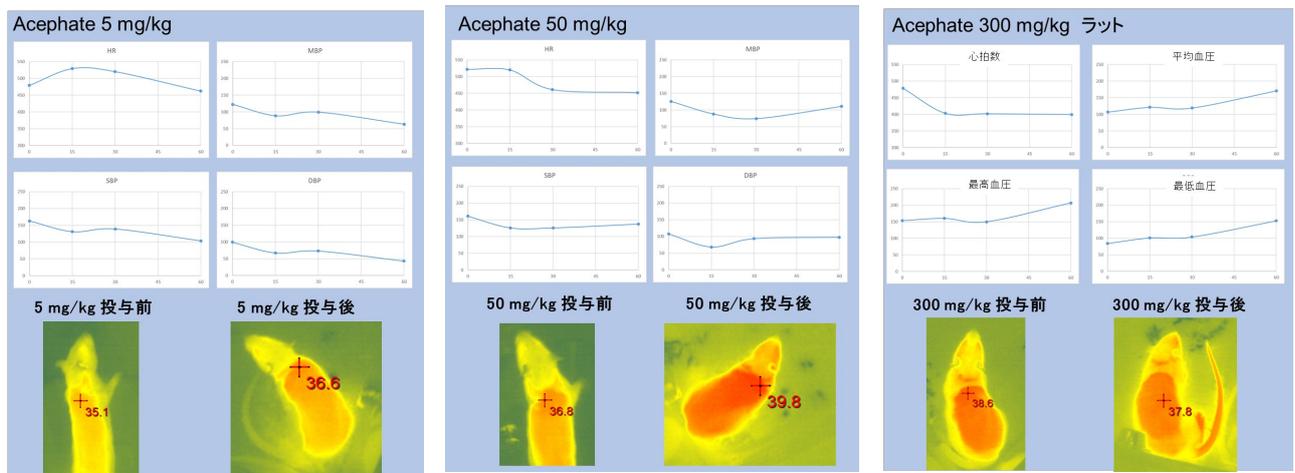
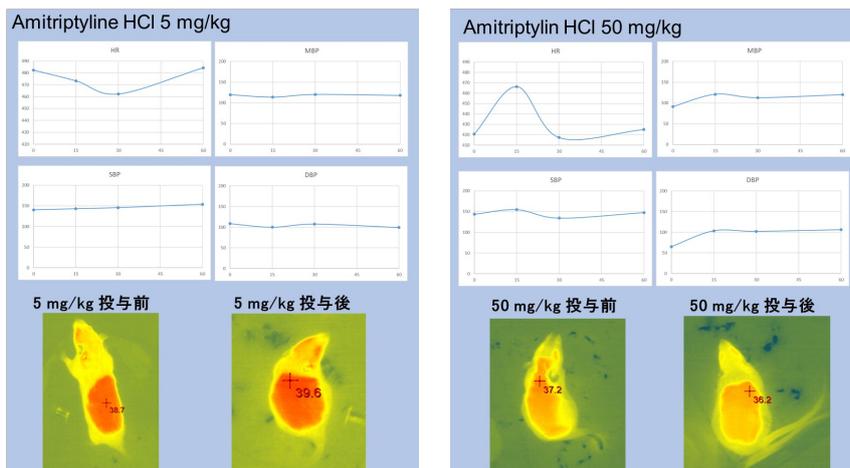


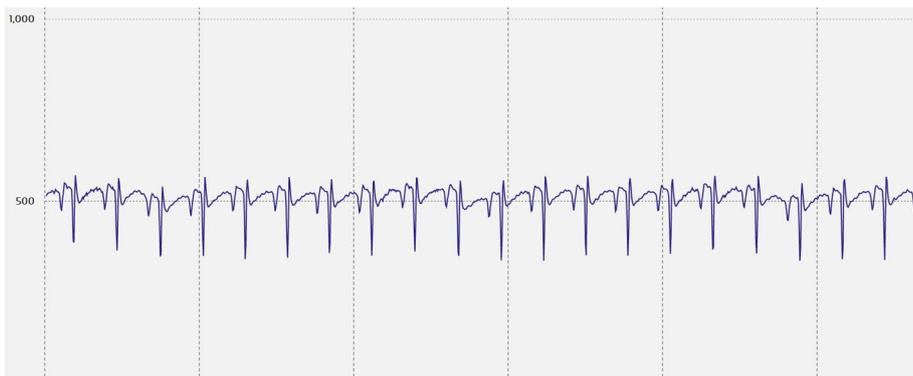
図 2 ラットを用いた化学物質の急性影響評価 (Acepate)

顕著な心拍数低下と血圧上昇がみられ伏臥位、呼吸異常がみられた。体表面温度は、僅かな低下がみられたが、尾部は顕著な温度上昇がみられた。



**図 3 ラットを用いた化学物質の急性影響評価 (Amitriptyline HCl)**

5mg/kg 投与により一過性の軽度の心拍数低下、体表面温度は上昇した。50mg/kg 投与では一過性の心拍数増加がみられたが、血圧には影響はみられなかった。体表面温度は心拍の上昇にともなって一過性に上昇したが、投与後 1 時間では投与前に比較して低下した。



**図 4 新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発**

無線による方法を用い、CNT センサーを動物の皮膚に単結紮した状態で、心電波形の取得に成功した。SD ラット 雌 10 週齢 イソフルラン麻酔下で測定、電極:CNT ヤーン、電極:耳介 青、頸部 赤、腰部:緑、A/D 変換・トランスミッター: BITalino (r)evolution。

バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発  
-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-(19KD1002)  
分担研究報告書

分担研究課題 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

研究分担者:	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 部長
研究協力者:	栗形麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者:	齊藤洋克	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	辻昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者:	森山紀子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

## 研究要旨

本分担研究では、急性毒性発現時の海馬、肺、肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器関連解析を実施した。具体的には、被験物質を単回経口投与後、得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報を既に開発済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器関連及びインフォマティクス解析の開発を進める計画である。

H31/R 元年度は、被験物質としてモデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX)を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与し、投与後の時間 4 点(投与 2, 4, 8 及び 24 時間後)、投与用量各 300, 100, 30, 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (溶媒:0.1%酢酸を含む 0.5%MC, pH3.5)の 4 点からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹のマウスについて解析を行った。なお用量設定に際しては、TTX のマウス経口 LD50 値が 334  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (RTECS 情報)であったことから、最高用量を 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  とし 3 段階の用量(700, 500, 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、及び溶媒対照)を設定し、予備試験を実施した。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、各群 3 匹に単回経口投与した。その結果、700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では全例、500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では 2 例に死亡が認められたが、300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群では死亡例はみられなかった。この結果から、24 時間無作用量であった 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$  を最高用量をとし、公比 $\sqrt{10}$  で除して 300, 100, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$  の投与用量を設定した。

脳の内、背景データが多く揃っている海馬における網羅的遺伝子発現変動解析をおこなった結果、ストレス関連遺伝子(Sgk1 遺伝子など)の発現増加が目立ち、他方、Na<sup>+</sup>チャンネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。この事は、海馬に対して TTX が直接作用するわけではなく、ストレス応答に絡むサイトカインや糖質コルチコイドなどのような二次的シグナルが海馬に働き、その結果、TTX の急性参照用量設定のための報告にあるように、apathy(無関心)といった中枢影

響が誘発されている事が示唆された。そこで今後、二次的シグナル候補物質を探索するために、海馬とは別に、肝における解析を検討し、多臓器連関解析を実施する予定である。

**R2** 年度も引き続き、急性毒性誘発モデル物質を単回経口投与した際の、海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施する。

## A. 研究目的

本研究の目的は、ReductionとRefinementによりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD50)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図る。一般状態、心電、心拍、血圧、体温、呼吸、脳波などの「バイタルサイン」を指標とした更なる動物数の削減とヒトの安全性確保の向上を可能とする「新規急性経口投与毒性試験方法」が、近年のITデバイスの小型化と新素材センサーの出現により開発可能となった。具体的には1匹の実験動物から多項目に亘るバイタルサイン(VS)を取得することにより毒性徴候を精緻に解析・定量化し、計算科学によって化学物質の急性毒性の強度と毒性標的の合理的判定基準を作成し、ヒトが急性曝露された際の危険度をより正確に予測する事を可能とする。これにより、毒物及び劇物取締法の指定に関して、中毒事象を含むより現実に想定される事故等に即した規制が可能となる。言い換えると、ヒトの急性中毒患者が救急外来で受ける諸検査に該当する所見を1匹の実験動物から取得する試験法の開発である。本研究は二つの大きな柱からなる。第一の柱は、「今までの情報や経験から選択したVSの諸項目の、急性毒性指標としての妥当性、再現性、信頼性、を確認する研究」である。これには、①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析、②急性毒性試験における行動解析の二つを分担研究課題として設定した。第二の柱は、「選択したVSの諸項目を正確に、実験動物から測定するためのデバイスの改良」である。これには、③新素材を用いたバイタルサインセンサーの開発、④バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発を分担研究課題として設定した。

本分担研究では、第一の柱の①急性毒性発現における遺伝子発現変動解析を扱う。

## B. 研究方法

計画通りに、H31/R元年度(初年度)は、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX)を選択し、雄性マウスに単回経

口投与した際の網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。以下に実験方法の概要を示す。遺伝子発現変動解析は、独自の遺伝子発現値の絶対化手法である Percellome 法(Kanno J et al, BMC Genomics 7 64 2006)を用いた。

### B-1 トキシコゲノミクス

雄性マウス(成熟期[12週齢])を対象とし、被験物質を、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)を用いて強制経口投与し、投与後の時間4点(投与2, 4, 8及び24時間後)、投与用量各300, 100, 30, 0  $\mu$ g/kg(溶媒:0.1%酢酸を含む0.5%MC, pH3.5)の4点からなる計16群、各群3匹、合計48匹のマウス各臓器について解析を行った。採取臓器は、海馬を含む脳4部位(海馬、皮質、脳幹、小脳)、肺及び肝とする。マウス各組織を採取後すみやかにRNA later (Ambion社)の入ったRNA用サンプルチューブ(キアゲン社)に採取し、4°Cで一晩浸漬し、RNaseを不活化した。

得られたマウスの海馬を含む脳4部位、肺及び肝のmRNAサンプルにつき、当方が開発したPercellome手法(遺伝子発現値の絶対化手法)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮しAffymetrix社GeneChip、Mouse Genome 430 2.0を使用する。4用量、4時点の遺伝子発現情報を既に開発済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器連関及びインフォマテイクス解析の開発を進める。

### B-2 被検物質

H31/R元年度(初年度)は、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX)(生化学用);分子量319.27、CAS No. 4368-28-9、富士フイルム和光純薬(株))を使用した。TTXの化学構造式を図1に示す(別添)。

カタログ番号:206-11071

ロット番号 :LKG5746

純度 :95.7 %[HPLC]

### B-3 用量設定実験

TTX のマウス経口 LD<sub>50</sub> 値が 334 µg/kg (RTECS 情報)であったことから、最高用量を 700 µg/kg とし 3 段階の用量(700, 500, 300 µg/kg、及び溶媒対照)を設定し、予備試験を実施した。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、各群 3 匹に単回経口投与した。その結果、700 µg/kg 群では全例、500 µg/kg 群では 2 例に死亡が認められたが、300 µg/kg 投与群では死亡例はみられなかった。この結果から、24 時間無作用量であった 300 µg/kg を最高用量をとし、公比√10 で除して 300, 100, 30µg/kg の投与用量を設定した

### B-4 統計処理

溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差(SD)にて示した。

### B-5 各遺伝子の発現変動の表示方法

実験結果における各遺伝子の発現変動を、下記図 2(別添)のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示す。具体的には、縦軸(Z 軸)に絶対値化した(細胞 1 個あたりのコピー数)mRNA の発現量を取り、X, Y 軸にはそれぞれ、投与用量とサンプリング時間をとり、各条件の n=3 の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)を示す。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版)」。

## C. 研究結果及び考察

### C-1 TTX をマウスに単回強制経口投与した際の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析:

解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意(t 検定での各時点毎に溶媒対照との間で P 値

<0.05)で、発現変動の最高値のコピー数が 2 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。その結果、発現が増加する遺伝子 286 プローブセット(ps) が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 121 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 508 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものは抽出されなかった。

増加分 121 ps について検討した結果、神経系の有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、ストレス応答遺伝子が見出せた。この内、顕著な発現変動が認められた、Nfkbia (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha) 、 Sgk1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1) 、 Mt1(metallothionein 1) 及び、 Mt2 (metallothionein 2) の 4 種の遺伝子の発現変動を図 3(別添)に示す。

次いで、発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(in silico)を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいは TNF が調節因子として抽出されてきた。抽出された上位 10 位のを図 4(別添)として示す(<E-7)。したがって、海馬における細胞に対してストレス応答が誘発されていることが明らかとなった。神経機能への影響などについてさらに詳細な解析を進めている。

他方、興味深いことに Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められないことが明らかとなった。この事は、TTX が血液脳関門を通過できないことを示しているものと考えられる。

近年、二枚貝から TTX が検出され、EU において貝類の TTX のリスク評価が行われ、TTX のリスクは国際的に注目されるようになってきている。欧州食品安全機関(EFSA)が取りまとめた報告書では、既往知見であるヒトに対する最低致死用量が 2 mg であることに疑問が示された。その一方で、マウス腹腔内投与毒性における半数致死量(LD<sub>50</sub>)を 9~12.5 µg/kg、経口投与における LD<sub>50</sub>を 232~532 µg/kg と推定し、また「単回経口投与の際の無気力状態(apathy)という一般状態変化を指標」とした急性参照用量(ARfD)を 0.25 µg/kgBW と導出し、貝類を 400 グラ

ム喫食した場合のヒトに対し有害な影響をもたらさない貝肉中の含有量を 44 µgTTX 等量/kg 貝肉と推定している。ARfD とは、ヒトがある物質を 24 時間以内に経口摂取した場合に、健康に悪影響を示さないと推定される一日当たりの摂取量である。

したがって、げっ歯類において単回経口投与した TTX が無気力状態(apathy) を誘発することから、中枢にはたらくことが明らかとなってきたが、TTX が血液脳関門を通過できないことから、この分子機序は不明である。

我々の海馬における網羅的遺伝子発現変動解析の結果からは、海馬に対して TTX が直接作用するわけではなく、ストレス応答に絡むサイトカインや糖質コルチコイドなどのような二次的シグナルが海馬に働き、その結果、TTX の急性参照用量設定のための報告にあるように、apathy (無関心) といった中枢影響が誘発されている事が示唆された。そこで今後、二次的シグナル候補物質を探索するために、海馬とは別に、肝における解析を検討し、多臓器連関解析を実施する予定である。

加えて今後、当毒性部が有する遺伝子発現データベース(100 種類以上の化学物質の単回投与データが含まれている)との参照解析を行い、より詳細な遺伝子発現変動解析をおこない、解析精度を上げる予定である

#### D. 結論

H31/R 元年度は、被験物質としてモデル物質として、フグ毒としてしられる TTX を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。脳の内、背景データが多く揃っている海馬における網羅的遺伝子発現変動解析をおこなった結果、ストレス関連遺伝子 (Sgk1 遺伝子など) の発現増加が目立ち、他方、Na<sup>+</sup>チャネルなど TTX が直接関与することが示唆されるシグナルネットワーク関連遺伝子の発現変動は認められなかった。この事は、海馬に対して TTX が直接作用するわけではなく、ストレス応答に絡むサイトカインや糖質コルチコイドなどのような二次的シグナルが海馬に働き、その結果、TTX の急性参照用量設定のための報告にあるように、apathy (無関心) といった中枢影響が誘発されている事が示唆された。そこで今後、二

次的シグナル候補物質を探索するために、海馬とは別に、肝における解析を検討し、多臓器連関解析を実施する予定である。

なお別添に表 1 として、遺伝子の発現変動が有意 (t 検定での P 値<0.05) で、発現変動の最高値の発現コピー数が 20 以上という条件下で自動抽出した全遺伝子のリストを示す。抽出された遺伝子数は 41 ps であった。

R2 年度も引き続き、急性毒性誘発モデル物質を単回経口投与した際の、海馬における網羅的遺伝子発現変動解析を実施する。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600-608, 2019.

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

北嶋 聡、エディトリアル:ドーピングの中毒学・毒性学—序文—、中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.) 32: 373-374.2019.

##### 2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

北嶋 聡、シックハウス(室内空気汚染)対策に関する

る研究-シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測-、環境科学会 2019 年会(2019.9.13.)名古屋

北嶋 聡、近藤一成、ゲノム編集技術応用食品の現状と課題、日本食品化学学会 第35回食品化学シンポジウム(2019.11.8.)東京

登田 美桜、北嶋 聡、フグ毒として知られるテトロドトキシンのリスク評価に関する国際的動向ーマウスユニットと急性参照用量ー、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)徳島

種村 健太郎、北嶋 聡、菅野 純、発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)徳島

小野 竜一、相崎 健一、北嶋聡、菅野 純、Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)徳島

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 —「新型」反復曝露試験の解析—、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)徳島

夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、Samik GOSH、北野 宏明、水口 賢司、菅野 純、Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)徳島

種村 健太郎、北嶋 聡、菅野 純、低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子ども

の毒性学に向けた評価系開発の現在～、第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)徳島

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.)ハワイ

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi, Evaluation of Exosomes as Toxic Biomarkers, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)ハワイ

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure.、IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)ハワイ

## G. 知的財産所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

別添

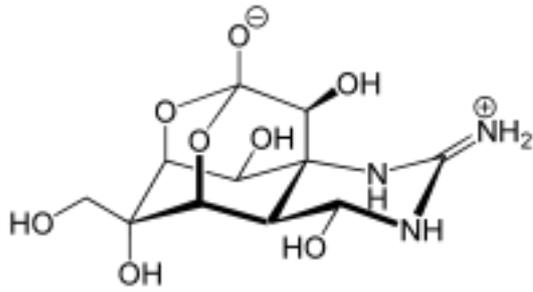


図 1 TTX の化学構造式

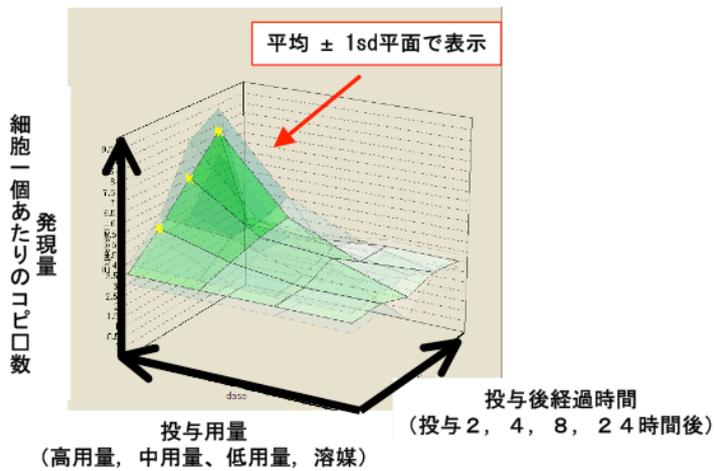


図 2 遺伝子発現変動を示す図

各遺伝子につき、濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元の曲面グラフとして示し、各条件の 3 サンプルの平均値を示す曲面と、その上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)をあわせて示した。一つの化学物質につき、約 45,000 枚の平面が描かれる。

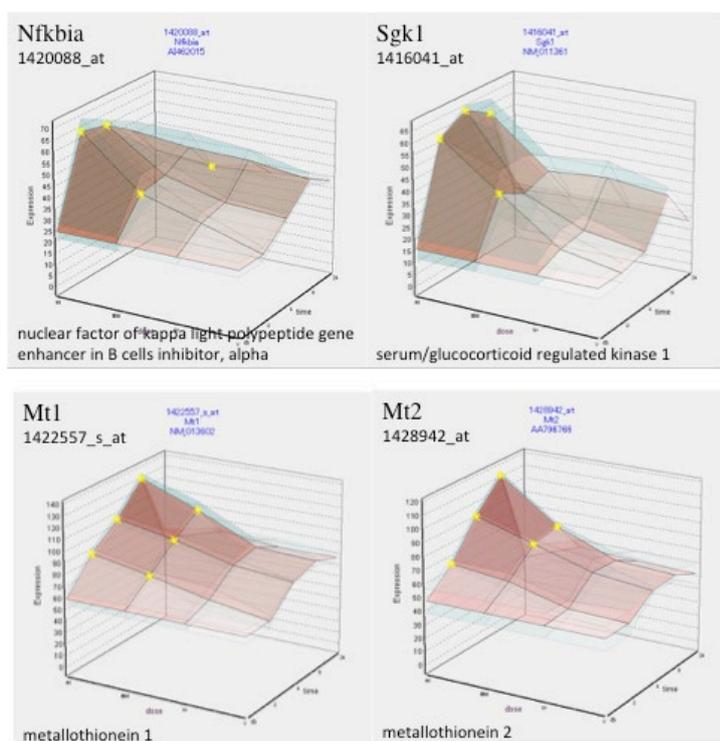


図3 TTX 単回経口投与時のマウス海馬におけるストレス応答関連遺伝子 Nfkb1a、Sgk1、Mt1 及び Mt2 遺伝子の発現変動

TTX 単回投与時にマウス海馬で発現増加が認められたストレス応答関連遺伝子の一部について発現変動の状態を示す。(※は、同時点の溶媒対象群に対して、 $p < 0.05$  で有意な変動であることを示す。)

Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
1 forskolin	chemical toxicant	1.07E-11	CDKN1A,CYP1B1,DIO2,ERRF1,EZR,FKB
2 dexamethasone	chemical drug	1.45E-10	ACSL3,ANGPTL4,CAPN1,CDKN1A,CYP1
3 dexamethasone phosphate	chemical drug	5.59E-10	ERRF1,GADD45G,Mt1,NFKBIA,PKK4,SG
4 progesterone	chemical - endogenous mammalian	6.57E-10	CDKN1A,CYP1B1,ERRF1,EZR,FKBP5,FL
5 R5020	chemical reagent	1.5E-09	CDKN1A,FKBP5,NFKBIA,PKK4,RASD1,S
6 beta-estradiol	chemical - endogenous mammalian	2.06E-09	ARID5B,C8orf44-SGK3/SGK3,CDKN1A,(
7 fluticasone propionate	chemical drug	4.45E-08	ANGPTL4,C8orf44-SGK3/SGK3,FKBP5,
8 4-hydroxytamoxifen	chemical drug	6.57E-08	CDKN1A,CYP1B1,ERRF1,NFKBIA,PKK4,
9 TNF	cytokine	0.00000097	ANGPTL4,ARID5B,ARRDC3,CDKN1A,CY
10 isobutylmethylxanthine	chemical toxicant	0.000000215	ACSL3,ANGPTL4,CDKN1A,Mt1,Mt2,PKK

図4 プロモーター解析(in silico) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果

ストレス応答に絡むデキサメタゾンあるいは TNF が調節因子として抽出されてきた。抽出された上位 10 位のもの示す。

表1

解析ソフト RSort を利用し、TTX 単回経口投与時のマウス海馬において遺伝子の発現変動が有意(t 検定での P 値<0.05)で、発現変動の最高値の発現コピー数が 20 以上という条件下で自動抽出した発現変動遺伝子のリスト [抽出された遺伝子数 41 ps] (抽出条件: Expand-H\_G2\_AP\_lmt\_Std-Av.RSSETA)

	AffyID	Gene Name	Yp1	Max	P1t-test
1	1420088_at	Nfkbia	02hr	63.64134	0.00057
2	1454617_at	Arrdc3	02hr	23.70482	0.000232
3	1449731_s_at	Nfkbia	02hr	23.7132	0.000711
4	1450779_at	Fabp7	02hr	31.83616	0.201092
5	1427036_a_at	Eif4g1	02hr	39.11248	0.010513
6	1426599_a_at	Slc2a1	04hr	22.51376	0.002754
7	1442025_a_at	---	04hr	24.98179	0.000183
8	1438157_s_at	Nfkbia	04hr	28.06098	9.81E-05
9	1416041_at	Sgk1	04hr	63.34757	1.69E-05
10	1424737_at	Thrsp	04hr	22.7152	0.002361
11	1419874_x_at	Zbtb16	04hr	20.14237	0.000103
12	1416101_a_at	Hist1h1c	04hr	36.78277	0.004478
13	1436994_a_at	Hist1h1c	04hr	23.0869	0.016792
14	1438976_x_at	Mat2a	04hr	42.69502	0.003144
15	1434773_a_at	Slc2a1	04hr	31.50373	0.006503
16	1435176_a_at	Id2	04hr	34.38144	0.035528
17	1438931_s_at	Sesn1	04hr	26.52597	0.013693
18	1450850_at	Ezr	08hr	22.95881	0.002087
19	1418937_at	Dio2	08hr	20.89047	0.017995
20	1416125_at	Fkbp5	08hr	26.96397	0.005959
21	1449335_at	Timp3	08hr	20.34981	0.001187
22	1427131_s_at	Lrrc58	08hr	39.43084	0.015814
23	1438251_x_at	Htra1	08hr	38.94385	9.89E-05
24	1422557_s_at	Mt1	08hr	130.7258	0.000154
25	1420772_a_at	Tsc22d3	08hr	40.7582	0.000237
26	1416332_at	Cirbp	08hr	27.44549	0.013735
27	1436263_at	Mobp	08hr	31.62599	0.04032
28	1428942_at	Mt2	08hr	112.2274	5.80E-05
29	1425281_a_at	Tsc22d3	08hr	26.69916	0.007722
30	1452757_s_at	Hba-a1 /// Hba-a2	08hr	80.1652	0.008202
31	1427226_at	Epn2	24hr	28.04525	0.205074
32	1452514_a_at	Kit	24hr	22.0232	0.669502
33	1420886_a_at	Xbp1	24hr	43.6829	0.215621
34	1427464_s_at	Hspa5	24hr	32.2643	0.512541
35	1416064_a_at	Hspa5	24hr	58.28615	0.822113
36	1437223_s_at	Xbp1	24hr	47.03686	0.433561
37	1417065_at	Egr1	24hr	54.92657	0.532709
38	1415834_at	Dusp6	24hr	22.21541	0.67941
39	1435638_at	Gsk3a	24hr	48.75392	0.603823
40	1423795_at	Sfpq	24hr	33.51739	0.758489
41	1438941_x_at	Ampd2	24hr	35.31098	0.047394

平成 31 年/令和元年度  
厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

**バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発  
-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-(19KD1002)**

**分担研究報告書**

**分担研究課題 急性経口投与毒性による行動様式影響における非侵襲的な  
新規バイタルサインの探索**

研究分担者

種村健太郎（東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野 教授）

**研究要旨**

本分担研究では、急性経口毒性発現時に動物が呈する行動様式影響を非侵襲的なバイタルサイン(VS)として利用するため、投与後動物の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化、超音波測定装置による超音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)を計測し、非侵襲的なバイタルサイン(VS)としての利用について検討する。今年度は、モデル化合物としてテトロドトキシン(300 $\mu$ g/kg)、アセフェート(50 および 300mg/kg)用いた成熟雄マウスへの投与実験を行った結果、テトロドトキシン投与群に体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が、またアセフェート投与群においても体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣、が観察され、特にアセフェート 300mg/kg 投与群では、重度の振戦と瞬目不全が観察された。尚、いずれの投与群にも超音波発声の確認には至らなかった。従来を目視観察による記述式の一般状態観察による毒性発現を VS 計測データ取得によりスコア化することによって標準化する為の基礎データを取得することに成功した。

## A. 研究目的

本研究の目的は、ReductionとRefinementによりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。現在、急性毒性において使用されているエンドポイントを「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化学物質の毒性強度の指標を「統計学」を背景とした「半数致死量(LD50)」から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」へ転換を図ることにあり、本分担研究では、特に実験動物の行動様式に顕れる影響を非侵襲的なバイタルサイン(VS)として利用するための計測手法の開発とそのスコア化による急性毒性指標の設定を目的とする。

## B. 研究方法

本分担研究では雄マウスを用いて、急性経口毒性発現時にマウスが呈する行動様式影響として投与後の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目)への影響、赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化、超音波測定装置による聴音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)を計測し、非侵襲的なバイタルサイン(VS)としての利用について検討する。今年度は、赤外線サーモグラフィによる体表温度と、超音波測定装置による聴音波発声の測定条件の設定を行うとともに、テトロドトキシン(300µg/kg)、アセフェート(50 および 300mg/kg)を用いた検討を行った。尚、アセフェートについてはOECD化学物質試験に関するガイドライン TG423(毒性等級法)にて設定されている5 mg/kg、50 mg/kg、300 mg/kg及び2,000 mg/kgの4段階から選択した。

## C. 研究結果

赤外線サーモグラフィによる体表温度の変化として、テトロドトキシン投与群に体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が、またアセフェート投与群においても体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が観察され、特にアセフェート300 mg/kg投与群では、重度の振戦と瞬目不全が観察された(図1)。尚、いずれの投与群にも超音波発声の確認には至らなかった。また、

超音波測定装置による聴音波発声(USVs: ultrasonic vocalizations)の測定については、測定条件設定を目的に性行動時の聴音波発声に成功したが、上記の投与条件下において、超音波発声の確認には至らなかった。

## D. 考察

赤外線サーモグラフィによる体表温度については、非常に有効なVSと考えられた。一方、超音波測定装置による聴音波発声については、測定条件を再検討すると共に、可聴域をも含めた解析が必要と考えられた。また、投与後の行動様式(移動量、移動様式、痙攣、流涎、瞬目等)影響は、上記の体表温度影響と高い相関があると考えられた為、動画データ取得による解析によって急性毒性指標の設定に向けた高度化が必要である。

## E. 結論

従来の目視観察による記述式の一般状態観察による毒性発現をVS計測データ取得によりスコア化することによって標準化する為の基礎データを取得することに成功した。今後、重度の振戦や瞬目不全についてもスコア化に向けた対応が必要であると考えられた。また超音波発声を含めた発声については雌雄差を含めた条件設定を進める必要があると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamashita S, Kogasaka Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sendai Y. Suppression of mosaic mutation by co-delivery of CRISPR associated protein 9 and three-primerepair exonuclease 2 into porcine zygotes via electroporation. J Reprod Dev. 2019 Nov 24. doi: 10.1262/jrd.2019-088. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31761839.

○ Saito H, Hara K, Tominaga T, Nakashima K, Tanemura K. Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory with the effects on neuronal and

glial population in adult male mice. *J Appl Toxicol.* 2019 Dec;39(12):1651-1662. doi: 10.1002/jat.3882. Epub 2019 Aug 15. PubMed PMID: 31415104

Goto M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Differences in resistance against osmotic challenge among C57BL/6, DBA/2 and their hybrid mice metaphase II (MII) stage oocytes. *Zygote.* 2019 Aug;27(4):250-254. doi: 10.1017/S0967199418000370. Epub 2019 Aug 9. PubMed PMID: 31397238.

Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. *Reprod Med Biol.* 2019 Jun 9;18(3):247-255. doi: 10.1002/rmb2.12283. eCollection 2019 Jul. Review. PubMed PMID: 31312103; PubMed Central PMCID: PMC6613016.

Kurata S, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. *J Reprod Dev.* 2019 Aug 9;65(4):327-334. doi: 10.1262/jrd.2019-008. Epub 2019 Jun 10. PubMed PMID: 31178551; PubMed Central PMCID: PMC6708848.

Umezu K, Yajima R, Hiradate Y, Yanai R, Numabe T, Hara K, Oikawa T, Tanemura K. Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. *J Reprod Dev.* 2019 Apr 12;65(2):147-153. doi: 10.1262/jrd.2018-147. Epub 2019 Jan 19. PubMed PMID: 30662011; PubMed Central PMCID: PMC6473113.

## 2. 学会発表

倉田笙平、小塩健介、高森広典、梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ブタ精子機能に対する GABA 影響解析」日本畜産学会第 127 回大会 (2020.3.25-28)、京都府

酒井和哉、原健士朗、種村健太郎「精巣毒性モデルマウスにおける精子エピゲノム影響評価」第 42 回日本分子生物学会年会 (2019.12.3-6)、博多市

影山恵理、沼邊孝、種村健太郎、原健士朗「ウシ精巣の対外培養における PDMS 製カバーの有用性」第126回日本畜産学会大会 (2019.9.17-20)、盛岡市

牧野優誠、平舘裕希、矢内凜、齊藤洋克、原健士朗、種村健太郎「ニコチン型アセチルコリン受容体シグナルを利用したマウス精子機能の調節」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

倉田笙平、平舘裕希、梅津康平、原健士朗、種村健太郎「 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を利用した精子機能制御法の開発に資する研究」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

矢内凜、平舘裕希、原健士朗、藤井渉、佐原成彦、種村健太郎「タウ欠損マウスを用いた精子におけるタウ類似タンパクの発現様式」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

梅津康平、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「ウシ精子を卵母細胞に導く走化性因子の特定」第112回日本繁殖生物学会大会 (2019.9.2-5) 札幌市

○ Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Takashi Tominaga, Kinichi Nakashima, Kentaro Tanemura 「Early-life exposure to low levels of permethrin exerts impairments in learning and memory associated with glial cell disturbance in adult male mice」the 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV) (2019.7.15-18) ホ

ノルル

○ 種村健太郎「非侵襲的な早期精巣毒性バイオマーカーとしての精子エピゲノム影響評価」第38回日本アンドロロジー学会学術大会(2019.6.21-22)大阪府

○ 種村健太郎、北嶋聡、菅野純「低用量科学物質の周産期ばく露による情動認知行動動毒性～子どもの毒性額にむけた評価系開発の現在～」第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

○ 種村健太郎、北嶋聡、菅野純「発生期マウスへ

の神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～」第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26-28)徳島市

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

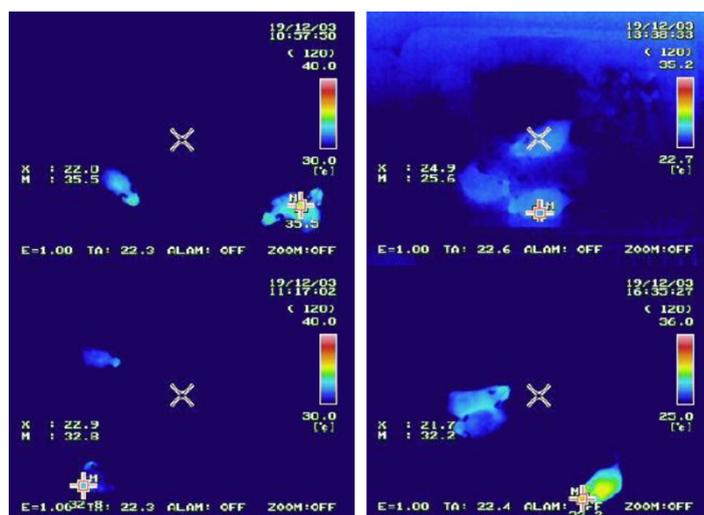


図1 急性毒性試験における行動解析(マウス Acephate 300 mg/kg 投与群)

体表温度の低下を伴う活動量低下と痙攣が観察され、特に Acephate 300 mg/kg 投与群では、重度の振戦と瞬目不全が観察された。

平成31年/令和元年度  
厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

## バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発 -統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-(19KD1002)

### 分担研究報告書

#### 分担研究課題 バイタルサインの統合的解析方法(ソフトウェア)の開発

研究分担者 相崎 健一

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 第一室長

### 研究要旨

バイタルサイン(VS)の統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発を目的とした本研究班において、最終的には、計測した VS の諸項目から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)を定義し、これを実装したソフトウェアの開発を目的とし、研究を行った。初年度となる平成31年/令和元年度は初年度である今期は VS 取得デバイスの開発中であり、評価対象とすべき実データを得られないため既存の情報から、パラメータに適した VS 項目の抽出や重み付け設定の参考になり得る情報の収集を実施した。また Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の定義に利用可能なアルゴリズムを調査し、有望なアルゴリズムを選定した。

#### A. 研究目的

バイタルサイン(VS)の統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発に際して、計測した VS の諸項目から「診断学」を基盤にした「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)を定義し、これを実装したソフトウェアの開発を目的とする。

#### B. 研究方法

##### B-1 既存情報の調査

「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の定義に組み込むのに適した VS 項目の抽出とそれらの重み付けの参考になる情報として、既存の情報を調査した。臨床医学、特に中毒学の情報源としては、日本中毒学会が編纂した成書を中心に参照した。化学物質の毒性・安全性の評価書としては、国立医薬品食品衛生

研究所の既存化学物質毒性データベース ([https://dra4.nihs.go.jp/mhlw\\_data/jsp/SearchPage.jsp](https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp))より入手したものを参照した。

## B-2 ソフトウェア生成

Windows 環境でのスタンドアロンソフトウェア作成においては、開発効率と生成する実行バイナリの実行速度を重視して、RAD(Rapid Application Development)対応の Delphi(Object Pascal 言語の一派生, USA, Embarcadero Technologies, Inc.)を用いた。データベースエンジンには組込型の DBISAM(USA, Elevate Software, Inc.)を、一般的なグラフ描画には TeeChart(Spain, Steema Software SL)を利用した。

人工知能利用の試行については、関連ライブラリが充実している Python 言語を使用した(特にデータサイエンス指向の Anaconda ディストリビューションを使用)。主なライブラリとしては Numpy(数値処理)や TensorFlow(機械学習)、scikit-learn(機械学習)、OpenCV(画像処理)を使用した。

## B-3 計算精度検証:

精度検証は必要に応じて Excel(USA Microsoft Corporation)や R 言語(オープンソース R Development Core Team)で実施し、浮動小数点誤差以上の乖離がないことを確認した。

## C. 研究結果

初年度である今期はバイタルサイン(VS)取得デバイスの開発中であり、評価対象とすべき実データを得られない。このため既存の情報から、パラメータに適した VS 項目の抽出や、「概略の致死量」を推定するための Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の定義において VS 項目毎の重み付け設定の参考になり得る情報の収集を実施した。

具体的には、臨床医学、特に内科診断学や中毒学の成書より、ヒトの治療において臨床医が重要視する VS 項目を抽出し、症状や曝露した化学物質な

どの状況に応じた重要度を、生物学的な根拠と共に調査した。同様に、化学物質の毒性・安全性に関する評価書から VS 項目を抽出し、それぞれの VS 項目の評価判断への寄与から当該項目の重要度を推定した。

臨床医学関連の成書を調査した結果では、一般所見のうち実験動物でも観察可能な VS 項目としては行動異常(情動認知障害(知覚異常、幻覚、意識障害、傾眠、興奮状態など)、運動機能を含む)や脈(心拍)、呼吸リズム、体温、血圧が重視されていた。また実験動物ではやや観察困難ではあるが、発汗や瞳孔サイズ(縮瞳・散瞳)、痙攣、流涎、尿所見、下痢も重要項目であった。一方、実験動物では観察が難しい VS 項目としては悪心や頭痛・腹痛等の各種疼痛、呼吸音(聴診)、口渇、排尿困難、皮膚所見(紅潮、皮疹、掻痒)、視覚異常(霧視など)があった。

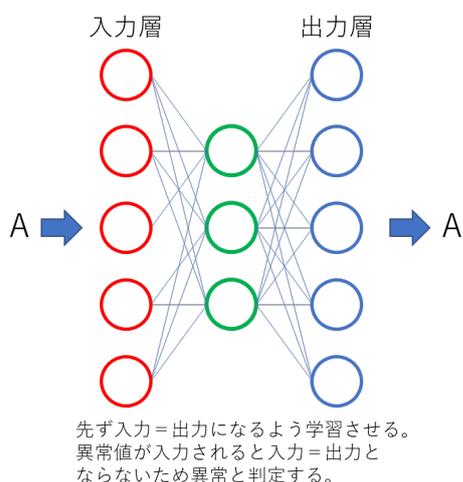
同様に、化学物質の毒性・安全性に関する評価書を調査した結果では、実験動物の一般所見として頻出していたのは、体重変化、摂餌量・飲水量の変化、であり、特記事項としては、体温変化(低体温)、運動変化(自発運動の低下、運動失調、麻痺、硬直、振戦、痙攣など)、意識状態(傾眠、昏睡、意識消失)、呼吸状態(呼吸促迫、呼吸困難)、皮膚刺激、脱毛、体位(腹臥、横臥)などの記載が見られた。

## D. 考察

化学物質の毒性・安全性に関する評価書では、一般所見に類するバイタルサイン(VS)項目の記載は体重変化と摂餌量・飲水量の変化がほとんどであり、これら以外の VS 項目は異状があった場合に必要に応じて言及される程度であり、副次的な扱いであった。ほとんど全ての評価書においては病理検査(データがある場合は血液学検査、血液生化学検査)の結果を毒性・安全性の評価の主たる根拠に採用していた。臨床医療においても画像診断や血液及び尿検査の結果を重視する同様の傾向があるが、一般的な診察において VS による健康状態の推察は基本技術であり、実験動物を用いた毒性試験ほどに VS が軽視されることは少ない。適切な VS 項目を選択し、正確且つ

高感度に実験動物の状態変化を観察・測定することができれば、検体である化学物質の毒性分子機序の推定に至ることは稀であっても、「概略の致死量」の推定に有効活用できる可能性は高いと考えられる。

実データが得られていない現時点で考察するのは尚早であるが、①少なくとも Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の定義内容を検討する初期段階では、異常状態のデータ数が正常(無処置)状態のデータ数より大幅に少ないと予想されること、及び②研究初期から毒性分子機序に基づく Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の定義は困難と考えられること、から、複数の VS 項目からの「概略の致死量」の推定を実現するためには、従来からの統計を含む数理的手法だけでなく、近年急速に発展した人工知能、特に深層学習を利用した手法の有用性が期待された。例えば、3層程度のニューラルネットワークにおいて、入力層と出力層に同じデータを用いて入力=出力となるように教師あり学習をさせる autoencoder というアルゴリズム(下図)は、VSデータの異常検出に利用可能と考えられる。



## E. 結論

初年度である今期はバイタルサイン(VS)取得デバイスの開発中であり、評価対象とすべき実データを得られないため既存の情報から、パラメータに適した VS 項目の抽出や重み付け設定の参考になり得る情

報を調査した。

また Acute Toxicity Vital Signs Score(仮称)の定義に利用可能なアルゴリズムを調査し、有望なアルゴリズムを選定した。来年度はVS取得デバイスによる実データを得て、代表的な異常検出アルゴリズムによるデータ処理を試みる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S1, Kanno J, Hirabayashi Y Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. Commun Biol. 2019, 2, 57.

### 2. 学会発表

小野 竜一, 相崎 健一, 北嶋聡, 菅野 純、Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響、第 46 回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)

菅野 純, 北嶋聡, 相崎 健一, 小野 竜一、Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 —「新型」反復曝露試験の解析—、第 46 回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)

夏目 やよい, 相崎 健一, 北嶋聡, Samik GOSH, 北野 宏明, 水口 賢司, 菅野 純、Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測、第 46 回日本毒性学会学術年会(2019.6.28.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019) (2019.7.16.)

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura 、 The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 、 IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019)] (2019.7.17.)

## **G. 知的所有権の取得状況**

### **1. 特許取得**

なし

### **2. 実用新案登録**

なし

### **3. その他**

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

#### IV. 倫理審査等報告書の写し

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・第三室・室長  
(氏名・フリガナ) 高橋 祐次・タカハシ ユウジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・部長  
(氏名・フリガナ) 北嶋 聡・キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 東北大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 大野 洋

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-
- 研究者名 (所属部局・職名) 大学院農学研究科・教授  
(氏名・フリガナ) 種村 健太郎・タネムラ ケンタロウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東北大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし、一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容: 研究実施の際の留意点を示した)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴彦



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした新規急性経口投与毒性試験方法の開発-統計学による半数致死量から診断学による概略の致死量への転換-
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部 室長  
(氏名・フリガナ) 相崎 健一・アイサキ ケンイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：遺伝子組換え実験安全管理規則)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。